



TITLE:

Studies on the novel bioactive peptide screening systems for G-protein coupled receptors and neuraminidase( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Shigemori, Tomohiro

---

CITATION:

Shigemori, Tomohiro. Studies on the novel bioactive peptide screening systems for G-protein coupled receptors and neuraminidase. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19048>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2016-04-01に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	重盛 智大
論文題目	Studies on the novel bioactive peptide screening systems for G-protein coupled receptors and neuraminidase (Gタンパク質共役受容体およびノイラミニダーゼを標的とした生理活性ペプチドの新規機能的探索法に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>G タンパク質共役受容体 (GPCR) は7回膜貫通型細胞膜受容体であり、様々な生理機能の調節や病態発症への関与が報告され、重要な創薬標的である。他方、インフルエンザウイルスは例年世界中で感染症を引き起こし、近年は強毒性や薬剤耐性ウイルスの出現が報告され、新規の薬剤および薬剤探索手法が求められている。ペプチドは低分子化合物および抗体の長所を兼ね備えていることから、新しい薬剤創製のための基質として現在期待されている。本研究では、GPCR の一つである GLP1 受容体 (Glucagon-like peptide 1 receptor; GLP1R)、およびインフルエンザウイルスの増殖に関わるノイラミニダーゼ(NA)に対する新規生理活性ペプチドの機能的スクリーニング手法の構築を試みた。</p> <p>1. 血糖調節に関わる GLP1R を標的とした酵母分泌ペプチドの機能的アッセイ系構築</p> <p>GLP1 は30 アミノ酸で構成されるペプチドホルモンであり、食物摂取に伴い小腸 L 細胞から血液中へ分泌され、膵β細胞上の GLP1R の活性化およびインスリン分泌促進を介して血糖低下に関わる。この GLP1R の強力アゴニストとしてアメリカドクトカゲから exendin4(Ex4)というペプチドが抽出されている。この Ex4 を分泌する酵母を作製するために、酵母α-factor 分泌シグナル遺伝子を5'末端に配置した Ex4 発現プラスミドを作製して酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742 に形質導入した。他方、GLP1R 遺伝子を哺乳類細胞 CHO へ導入し、GLP1R 発現細胞を作製した。6well-plate にて酵母増殖および GLP1R 活性化に適した培地を検討したところ、合成デキストロース (SDC) 培地およびダルベッコ改変培地 (DMEM) がそれぞれ適すると分かった。次に、高速多検体処理が可能な 96-well plate において GLP1R アッセイに必要な酵母数およびその必要酵母数に到達するための培養時間を評価した結果、酵母を SDC 培地にて48 時間培養することにより活性検出に十分な 10<sup>6</sup>細胞が得られることを確認した。</p> <p>以上の結果から、(1) ペプチド分泌用プラスミドで形質転換した酵母コロニーを SDC 培地が入った 96-well plate へ植菌・培養し、(2) DMEM 培地へと置換して培養し、(3) 培養上清を GLP1R 細胞に添加し、ELISA により受容体活性化を評価するという酵母分泌ペプチドに対する活性検出システムを構築した。</p> <p>Ex4 分泌酵母に加えて、GLP1、2 位のアラニンをセリンに変異処理した S<sup>2</sup>-GLP1、FLAG 配列 (DYKDDDDK) を C 末端に融合させた GLP1FLAG および S<sup>2</sup>-GLP1FLAG を分泌する酵母を作製し、本システムにより活性評価したところ、コントロールに比べて GLP1FLAG および S<sup>2</sup>-GLP1FLAG 分泌酵母はそれぞれ 46 倍および 21 倍の活性を示し、また FLAG 不含ペプチドに対して約 10 倍の高活性を示した。</p> <p>本活性検出システムを用いて Ex4 分泌酵母のモデルスクリーニングを実施したところ、Ex4 分泌酵母が存在する well を GLP1R 活性化を指標にして特定することができた。GLP1R 活性が陽性および陰性であった well から寒天培地上に作製した酵母コロ</p>			

ニーに対してダイレクト PCR を実施し、分泌ペプチドに相当する遺伝子型を分析したところ、陰性 well の酵母コロニーからは Ex4 遺伝子は全く検出されなかった。一方、陽性 well では Ex4 遺伝子を有する酵母が検出できた。以上から、本研究で確立したペプチド分泌酵母および GPCR 発現哺乳類細胞で構成されるアッセイ系は、精製や濃縮・化学合成を必要とせずに遊離ペプチドの活性評価が可能であり、また新規活性ペプチドの探索手法としても有用であることが判明した。

## 2. 酵母ペプチド分泌系を用いたランダム変異 GLP1 ライブラリのスクリーニング

多検体高速処理のために、GLP1R の活性化に応答して発光する分泌型ルシフェラーゼを用いたレポーター細胞を新たに構築した。次に、変異誘発性デオキシヌクレオチドを用いた PCR によりランダム変異 GLP1 ライブラリを作製し、酵母に導入し、GLP1 ライブラリ分泌酵母を作製した。約 400 コロニーのランダム変異 GLP1 分泌酵母をレポーターアッセイによりスクリーニングした結果、天然型である GLP1FLAG に比べて約 1.7 倍高活性な変異 GLP1 を単離することに成功した。

## 3. 薬剤耐性ノイラミニダーゼ(NA)提示酵母の作製および薬剤スクリーニングへの応用

タミフル耐性インフルエンザウイルスは、H274Y 変異 NA (274 位のヒスチジンをチロシンに変異させた NA)を有する。薬剤耐性 NA に対する阻害剤探索のために、モデル系として野生型に加えてタミフル耐性 NA を表層提示した酵母の作製を試みた。野生型もしくは H274Y 変異 NA を酵母壁タンパク質 $\alpha$ -agglutinin の N 末端に融合し、*S. cerevisiae* BY4742 に発現させ、NA 提示酵母を作製した。野生型およびタミフル耐性 NA とともに、培養 24 時間から 72 時間で有意な酵素活性を示すことが分かった。なお、野生型に比べて H274Y 変異 NA は約 2 倍低い酵素活性を示し、既報告と一致した。次に、医薬応用されている NA 阻害剤 2 種（タミフルおよびリレンザ）について表層提示 NA に対する阻害特性を評価した。野生型 NA はタミフルおよびリレンザにより用量依存的に活性阻害されたのに対して、H274Y 変異 NA はタミフルによる阻害をほとんど受けなかったことから、表層提示 NA は天然のウイルス NA と同様の生化学的性質を有していることが分かった。

これまでの研究では、昆虫細胞で分泌生産された NA は 37°C で著しく失活することが報告されている。そこで、酵母表層提示 NA に対する熱安定性を評価したところ、4°C と 37°C においてほぼ同等の活性を保持しており、酵母表層提示 NA は熱安定性が高いと推察された。

これらの結果から、酵母表層提示技術によりインフルエンザウイルス NA を酵素活性および生化学的特性を有したまま迅速に調製でき、また、熱安定性も保持できることから、薬剤探索における標的タンパク質調製法として有用性の高い手法であることが判明した。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 8 字×3 6 行で作成し、合わせて、3,0 0 0 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、4 0 0 ～ 1,1 0 0 words で作成し  
審査結果の要旨は日本語 5 0 0 ～ 2,0 0 0 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ペプチドを基盤とした創薬を目的とし、各種ペプチドを分泌するように改変した酵母を作製した。一方、創薬標的としてGPCRの一つGLP1受容体(GLP1R)およびインフルエンザウイルスの増殖に関わるノイラミニダーゼ(NA)をそれぞれ哺乳類細胞および酵母表層に機能的に発現させた。両者を組み合わせ、新規生理活性ペプチドの機能的スクリーニング手法の構築を試みた。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 酵母に分泌生産させた各種 GLP1R アゴニスト候補ペプチドの機能的活性を GLP1R 発現哺乳類細胞によって直接検出するシステムを初めて構築した。さらに、本システムを用いたモデルスクリーニングでは活性ペプチド分泌酵母のみを単離することができた。本システムでは、酵母分泌ペプチドの精製・濃縮および遊離ペプチドを得るための化学合成を必要とせず、有用性の高いペプチド活性評価システムであることが判明した。
2. GLP1R の活性化に応答して化学発光するレポーターアッセイシステムを新たに構築し、酵母ペプチド分泌系と組み合わせた。これにより多検体の高速処理が可能となり、ランダム変異 GLP1 ライブラリのスクリーニングを行うことが可能になった。
3. インフルエンザウイルスの増殖に関わる野生型および薬剤耐性型 NA の酵母表層提示に成功した。また、本表層提示 NA はウイルス NA に近い生化学的特性を示した。表層提示 NA は酵母を培養するだけで簡単に調製することができ、本アプローチは薬剤探索において変異の多いウイルス性感染症を標的とした創薬研究に貢献できる技術であることが判明した。

以上のように、本論文では、ペプチド探索源として酵母を利用する一方で、標的分子を哺乳類細胞や酵母表層に発現させ、両者を組み合わせることによって新しい機能的スクリーニング手法を初めて構築した。実際に、酵母に分泌生産させたランダム変異 GLP1 ライブラリのスクリーニングでは、天然型 GLP1 よりも高活性なアゴニストを取得することに成功した。これらの結果は、生体高分子化学、細胞生化学、微生物学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年2月5日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：        年        月        日以降（学位授与日から3ヶ月以内）